

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧНИЙ РОЗДІЛ

УДК 612.314+615.322

**А. П. Левицький<sup>1</sup>, д. биол. н., А. И. Фурдычко<sup>2</sup>, к. мед. н., О. Е. Успенский<sup>3</sup>, А. М. Сенникова<sup>1</sup>, С. В. Гончарук<sup>1</sup>, к. мед. н.**

<sup>1</sup>Государственное учреждение «Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной академии медицинских наук Украины»

<sup>2</sup>Львовский национальный медицинский университет им. Данилы Галицкого

<sup>3</sup>Харьковский национальный медицинский университет

### ВЛИЯНИЕ ВНУТРИДЕСНЕВОГО ВВЕДЕНИЯ МИКРОБНЫХ ПАТОГЕНОВ НА СТЕПЕНЬ ДИСБИОЗА И АНТИОКСИДАНТНУЮ АКТИВНОСТЬ В ДЕСНЕ И СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

Введение в десну растворов ЛПС, гиалуронидазы или трипсина вызывает в десне и в сыворотке крови развитие дисбиоза и увеличивает уровень антиоксидантной защиты, больше выраженный для гиалуронидазы.

**Ключевые слова:** липополисахарид, гиалуронидаза, трипсин, десна, сыворотка крови, уреазы, лизоцим, каталаза.

**А. П. Левицький<sup>1</sup>, А. І. Фурдичко<sup>2</sup>, О. Є. Успенський<sup>3</sup>, Г. М. Сеннікова<sup>1</sup>, С. В. Гончарук<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії Національної академії медичних наук України»

<sup>2</sup>Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

<sup>3</sup>Харківський національний медичний університет

### ВПЛИВ ВНУТРИШНЬОЯСЕННОГО ВВЕДЕННЯ МИКРОБНИХ ПАТОГЕНІВ НА СТУПІНЬ ДИСБІОЗА ТА АНТИОКСИДАНТНУ АКТИВНІСТЬ В ЯСНАХ І СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ

Введення в ясна розчинів ЛПС, гіалуронідази або трипсину викликає в яснах і в сироватці крові розвиток дисбіозу та збільшення рівня антиоксидантного захисту, більш вираженого для гіалуронідази.

**Ключові слова:** ліпополісахарид, гіалуронідаза, трипсин, ясна, сироватка крові, уреазы, лізоцим, каталаза.

**A. P. Levitsky<sup>1</sup>, A. I. Furdychko<sup>2</sup>, O. E. Uspenskiy<sup>3</sup>, A. M. Sennikova<sup>1</sup>, S. V. Goncharuk<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>State Establishment «The Institute of Stomatology and Maxillo-Facial Surgery of the National Academy of Medical Science of Ukraine»

<sup>2</sup>Lviv National Medical University named after Danylo Galytskyj

<sup>3</sup>Kharkov National Medical University

### THE INFLUENCE OF INTRAGUM INTRODUCTION OF MICROBIAL PATHOGENS ON THE DEGREE OF DYSBIOSIS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY IN RAT AND SERUM

#### ABSTRACT

**The aim:** To investigate the microbial pathogens (LPS, hyaluronidase and trypsin) actions on state of endogenic microbiocenose, antimicrobial and antioxidant defenses in parodontе and serum.

**The materials and methods.** Microbial pathogens were introduced into rat gum hear molar radices. After 3 hours determined activity urease, lysozyme, catalase and content of MDA in gum and serum.

**The findings.** The introduction of trypsin decreased lysozyme activity in gum and increased activity of urease and catalase into serum. The introduction of hyaluronidase decreased urease activity into gum but increased catalase activity into gum and serum. The introduction of LPS increased urease activity into serum and increased catalase activity into gum and serum.

**The conclusion.** The intragum introduction of the microbial pathogens (LPS, hyaluronidase, trypsin) provoke bacteriemia and activation of antioxidant system into gum and serum.

**Key words:** lipopolysaccharide, hyaluronidase, trypsin, gum, serum, urease, lysozyme, catalase.

Роль микробного фактора в патогенезе захворювання пародонта підтверджена численними експериментальними і клінічними дослідженнями [1-5]. Як відомо, патогенне діяння мікробів на ткани реалізується через утворення микробних патогенів (токсинів) [6-9]. К числу останніх відносяться кишечний ендотоксин (ліпополісахарид, ЛПС) [10], уреазы [11], ферменти гіалуронідаза [12, 13], протеазы [8] і інші.

ЛПС активує провоспалительні системи організму, уреазы рясцеляє мочевину, утворює ядовитий амміак, гіалуронідаза рясцеляє гіалуронову кислоту («міжклітинний цемент»), збільшує проникність гісто-гематических бар'єрів, що сприяє транслокації бактерій і їх токсинів. Протеазы, виділяемі бактеріями, рясцеляють захисні білки – лізоцим, імуноглобуліни, а також колаген.

**Цель настоящего исследования.** Определение влияния микробных патогенов (ЛПС, гиалуронидаза, протеаза), вводимых в ткань десны, на состояние эндогенного микробиоценоза, антимикробной и антиоксидантной защиты в пародонте и в сыворотке крови.

**Материалы и методы исследования.** В работе был использован ЛПС из *E. coli* 0111B4 производства «Sigma», США, бактериальная гиалуронидаза с активностью 500 ед/мг производства «Sigma», США и в качестве протеазы – трипсин из панкреас с активностью 400 ед/мг производства «Merck» (ФРГ).

Эти препараты использовали в виде растворов на 0,9 %-ном NaCl с концентрацией: ЛПС – 1 мг/мл, гиалуронидаза – 2 мг/мл и трипсин – 5 мг/мл.

Эксперименты были проведены на белых крысах линии Вистар (самцы, возраст 2 года, средняя живая масса 332±15 г), распределенных в 4 группы: 1-ая – контроль; 2-ая – ЛПС, 3-я – гиалуронидаза и 4-ая – трипсин. Растворы патогенов вводили в десну в районе корней моляров в дозе 0,2 мл на крысу. Контрольным крысам вводили 0,2 мл 0,9 %-ного NaCl.

Эвтаназию животных осуществляли через 3 часа под тиопенталовым наркозом (20 мг/кг) путем тотального кровопускания из сердца. Иссекали десну из зоны введения препаратов и получали сыворотку крови.

В гомогенатах десны и в сыворотке определяли активность уреазы [14], как маркера микробного обсеменения, лизоцима [15], как показателя неспецифи-

ческого иммунитета, каталазы [16], являющейся антиоксидантным ферментом. По соотношению относительных активностей уреазы и лизоцима рассчитывали степень дисбиоза по Левицкому [17], а по соотношению активности каталазы и содержания малонового диальдегида (МДА) [18] рассчитывали антиоксидантно-прооксидантный индекс АПИ [16].

Результаты исследований подвергали стандартной статобработке [19].

**Результаты и их обсуждение.** В таблице 1 представлены результаты определения в десне активности уреазы и лизоцима. Из этих данных видно, что введение патогенов не сказалось на уровне уреазы, однако введение трипсина вызвало достоверное снижение активности лизоцима, свидетельствующее о падении уровня неспецифического иммунитета в пародонте.

Таблица 1

**Влияние микробных патогенов на активность уреазы и лизоцима в десне крыс**

№№ пп	Группы	Уреазы, мк-кат/кг	Лизоцим, ед/кг
1	Контроль	0,177±0,034	287±25
2	ЛПС	0,169±0,061 p>0,8	300±36 p>0,5
3	Гиалуронидаза	0,084±0,010 p<0,05	258±31 p>0,3
4	Трипсин	0,163±0,082 p>0,5	214±23 p<0,05

Таблица 2

**Влияние микробных патогенов на активность уреазы и лизоцима в сыворотке крови крыс**

№№ пп	Группы	Уреазы, нкат/л	Лизоцим, ед/л
1	Контроль	0,90±0,08	78±18
2	ЛПС	1,68±0,99 p<0,05	121±31 p>0,05
3	Гиалуронидаза	1,04±0,22 p>0,3	107±11 p>0,05
4	Трипсин	2,82±0,61 p<0,01	73±3 p>0,3

Таблица 3

**Влияние микробных патогенов на активность каталазы и индекс АПИ в десне крыс**

№№ пп	Группы	Каталаза, мкат/кг	АПИ
1	Контроль	4,33±0,30	6,33±0,52
2	ЛПС	6,56±0,50 p<0,05	5,03±0,53 p>0,05
3	Гиалуронидаза	8,17±0,39 p<0,001	7,35±0,70 p<0,05
4	Трипсин	8,02±0,39 p<0,001	7,66±0,72 p<0,05

**Влияние микробных патогенов на активность каталазы и индекс АПИ  
в сыворотке крови крыс**

№№ пп	Группы	Каталаза, мкат/л	АПИ
1	Контроль	0,294±0,013	4,19±0,43
2	ЛПС	0,555±0,014 p<0,01	9,08±1,07 p<0,01
3	Гиалуронидаза	0,508±0,016 p<0,01	7,29±0,74 p<0,05
4	Трипсин	0,523±0,016 p<0,01	6,99±0,70 p<0,05

В таблице 2 показаны изменения активности уреазы и лизоцима в сыворотке крови. Видно, что введение ЛПС и, особенно, трипсина существенно повышает в сыворотке активность уреазы, свидетельствующее о бактериемии, поскольку уреазы имеет микро-

бное происхождение, а соматические клетки ее не синтезируют [14].

Введение ЛПС проявляет тенденцию к росту активности лизоцима, что может быть обусловлено активацией секреции лизоцима нейтрофилами под влиянием ЛПС.

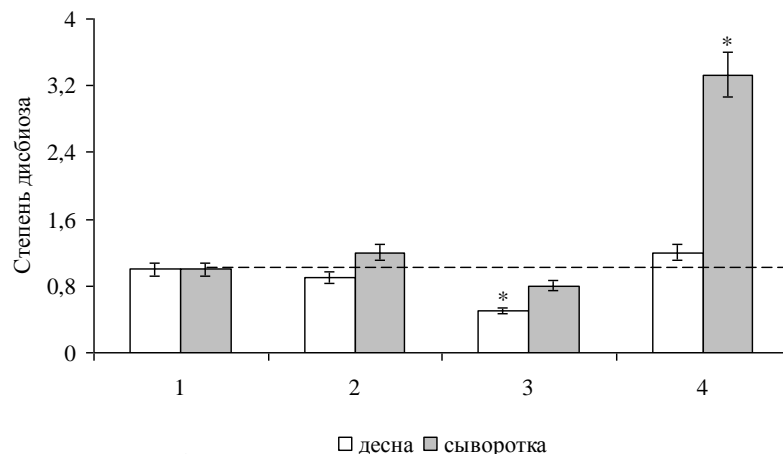


Рис. Влияние микробных патогенов на степень дисбиоза в десне и в сыворотке крови крыс

Рассчитанная по соотношению уреазы и лизоцима степень дисбиоза представлена на рисунке, из которого следует, что введение гиалуронидазы снижает степень дисбиоза в десне, а введение трипсина резко увеличивает степень дисбиоза в сыворотке крови.

В таблице 3 представлены результаты определения в десне активности каталазы и индекса АПИ. Видно, что введение патогенов достоверно увеличивает активность каталазы (особенно, гиалуронидаза и трипсин). Эти же патогены достоверно увеличивают и индекс АПИ, свидетельствующий о повышенном уровне антиоксидантной системы пародонта под влиянием гиалуронидазы и трипсина.

В таблице 4 представлены аналогичные показатели для сыворотки крови. Видно, что все три патогена достоверно повышают активность каталазы (в 1,7-1,9 раза) и показатель АПИ (в 1,7-2,2 раза), причем в наибольшей степени ЛПС. Если признать за антиоксидантной системой важную защитную функцию в организме, то полученные данные свидетельствуют о способности избранных нами микробных патогенов (в этой дозе) повышать резистентность организма.

**Вывод.** Интрадентальное введение микробных патогенов (ЛПС, гиалуронидазы и трипсина) вызыва-

ет бактериемию и активизацию антиоксидантной системы сыворотки крови и десны.

#### Список литературы

1. Микрофлора полости рта: норма и патология / [Е. Г. Зеленова, М. И. Заславская, Е. В. Салина и др.]. – Н. Новгород: НГМА, 2004 – 158 с.
2. Кухарская О. Г. Микробиологический баланс полости рта у больных пародонтитом / О. Г. Кухарская, М. Д. Король // Украинский стоматологичний альманах. – 2007. – № 1. – С. 58-61.
3. Черда В. В. Микрофлора як фактор виникнення запальних хвороб пародонта / В. В. Черда // Украинский стоматологичний альманах. – 2007. – № 1. – С. 77-80.
4. Цепов Л. М. Роль микрофлоры в возникновении воспалительных заболеваний пародонта / Л. М. Цепов, Н. А. Голева // Пародонтология. – 2009. – № 1(50). – С. 7-12.
5. Распространенность грибковой флоры и особенности микробиоценоза у лиц с интактным пародонтом и с хроническими воспалительными заболеваниями пародонта / О. А. Чепуркова, М. Г. Чеснокова, В. Б. Недосеко [и др.] // Пародонтология. – 2009. – № 1(50). – С. 60-65.
6. Бондаренко В. М. Факторы патогенности бактерий и их роль в развитии инфекционного процесса / В. М. Бондаренко // ЖМЭИ. – 1999. – № 5. – С. 34-39.
7. Virulence mechanisms of periodontopathic bacteria and host responses / K. Ishihara, T. Miura, A. Yamanaka [et al.] // Bull. Tokyo dent. Coll. – 2001. – v. 42, № 2. – P. 105-108.
8. Флуер Ф. С. Энтеротоксины *Bacillus cereus* / Ф. С. Флуер // ЖМЭИ. – 2007. – № 2. – С. 105-110.

9. **Кутевляк В. Ф.** Микробная флора полости рта в норме и ее повреждающие факторы при патологии / В. Ф. Кутевляк // Стоматолог. – 2011. – № 10(160). – С. 28-31.

10. **Wang X.** Endotoxins: structure, function and recognition / X. Wang, P. Quinn // *Serial: Subcellular Biochemistry*. – 2010. – v. 53. – 415 p.

11. **Сухарев Ю. С.** Энтеротоксин-продуцирующие патогенные *Escherichia coli* / Ю. С. Сухарев. – Харьков: Коллегиум, 2008. – 346 с.

12. **Гириш К. С.** Ингибирование гиалуронидазы яда индийской кобры биоактивными компонентами и полисахаридами растений / К. С. Гириш, К. Кемпараджу // *Биохимия*. – 2005. – т. 70, вып. 8. – С. 1145-1150.

13. **Роль** гиалуронидазы в регуляции гемопоэза / Г. Н. Зюзков, В. В. Жданов, А. И. Дыгай [и др.] // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2007. – т. 144, № 12. – С. 690-695.

14. **Гаврикова Л. М.** Уреазная активность ротовой жидкости у больных с острой и одонтогенной инфекцией челюстно-лицевой области / Л. М. Гаврикова, И. Т. Сегень // *Стоматология*. – 1996. – Спецвыпуск. – С. 49-50.

15. **Левицкий А. П.** Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий. – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.

16. **Биохимические** маркеры воспаления тканей ротовой полости: методические рекомендации / А. П. Левицкий, О. В. Денга, О. А. Макаренко [и др.] – Одесса: КП ОГТ, 2010. – 16 с.

17. **Патент** на корисну модель, Україна 43140, МПК (2009) G01N 33/48. Спосіб оцінки ступеня дисбіозу (дисбактеріозу) органів і тканин / Левицький А. П., Денга О. В., Селіванська І. О. [та ін.]. – Опубл. 10.08.2009, Бюл. № 15.

18. **Стальная И. Д.** Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: *Современные методы в биохимии* / И. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвили. – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

19. **Кокунин В. А.** Статистическая обработка данных при малом числе опытов / В. А. Кокунин // *Український біохімічний журнал*. – 1975. – т. 47, № 6. – С. 776-791.

#### REFERENCES

1. **Zelenova E. G., Zaslavskaya M. I., Salipa E. V.** [i dr.]. *Microflora polosti rta: norma i patologiya* [Microflora of oral cavity: the norm and the pathology] N. Novgorod, NGMA, 2004: 158.

2. **Kukharskaya O. G., Korol' M. D.** The microbial balance of oral cavity in parodontite patients. *Ukrain's'kyj stomatologichnyj al'manah*. 2007; 1: 58-61.

3. **Chereda V. V.** Microflora as factor of development of inflammation diseases of parodontite. *Ukrain's'kyj stomatologichnyj al'manah*. 2007; 1: 77-80.

4. **Tseпов L. M., Goleva N. A.** The role of Microflora in development of inflammation diseases on parodontite. *Parodontologiya*. 2009; 1(50): 7-12.

5. **Chepurkova O. A., Chesnokova M. G., Nedoseko V. B.** [i dr.]. The fungus flora sprading and peculiarity of microbiocenose in patients with intact parodontitis and with chronic inflammation. *Parodontologiya*. 2009; 1(50): 60-65.

6. **Bondarenko V. M.** The factors of bacterial pathogenity and its roles in the development of infections processes. *ZhMEI*. 1999; 5: 34-39.

7. **Ishihara K., Miura T., Yamanaka A.** [et al.]. Virulence mechanisms of periodontopathic bacteria and host responses. *Bull. Tokyo dent. Coll.* 2001; 42(2): 105-108.

8. **Fluer F. S.** Enterotoxins of *Bacillus cereus*. *ZhMEI*. 2007; 2: 105-110.

9. **Kutsevlyak V. F.** Microbial flore of oral cavity and her damage factors at pathology. *Stomatolog*. 2011; 10(160): 28-31.

10. **Wang X., Quinn P.** Endotoxins: structure, function and recognition. *Serial: Subcellular Biochemistry*. 2010; 53: 415.

11. **Sukharev Yu. S.** *Enterotoksin-produtsiruyushchie patogennye Escherichia coli* [The enterotoxin-producent pathogenic *Escherichia coli*]. Khar'kov, Kollegium, 2008: 346.

12. **Girish K. S., Kemparadzhu K.** The inhibition indian cobra's venom hyaluronidase by the bioactive components and plants' polysaccharides. *Biokhimiya*. 2005; 70(8): 1145-1150.

13. **G. N. Zyuz'kov, V. V. Zhdanov, A. I. Dygay** [i dr.]. The role of hyaluronidase in hemopoese regulation. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny*. 2007; 144(12): 690-695.

14. **Gavrikova L. M., Segen I. T.** Urease activity of oral liquid in patients with acute odontogenic infection of maxillo-facial part. *Stomatologiya*. 1996; The extra issue: 49-50.

15. **Levitsky A. P.** *Lizotsym vmesto antibiotikov* [Lysozyme instead of antibiotics]. Odessa, KP OGT, 2005: 74.

16. **Levitsky A. P., Denga O. V., Makarenko O. A.** [i dr.]. *Biokhimicheskie markery vospaleniya tkaney rotovoy polosti: metodicheskie rekomendatsii* [Biochemical markers of inflammation of oral cavity tissue: method guidelines]. Odessa, KP OGT, 2010:16.

17. **Levitsky A. P., Denga O. V., Selivanskaya I. A.** [ta in.]. The method of estimation of the degree of dysbiosis (dysbacteriosis) of organs and tissues. Patent of Ukraine 43140. IPC (2009) G01N 33/48. Application number u 200815092. Date of filling: 26.12.2008. Publ.: 10.08.2009. Bul. № 15.

18. **Stalnaya I. D., Garishvili T. G.** *Metod opredeleniya malonovogo dialdegida s pomoshchyu tiobarbiturovoy kisloty* [The method of revelation of malonic dialdehyde with thiobarbituric acid]. Moskva, Meditsina, 1977: 66-68.

19. **Kokunin V. A.** Statistical processing of data for a small number of experiments. *Ukrain's'kyj biokhimichnyj zhurnal*. 1975; 47(36): 776-791.

Поступила 01.02.17



УДК 612.014.1

**И. Г. Топов**

Государственное учреждение «Институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Национальной академии медицинских наук Украины»

#### ОТСУТСТВИЕ ПРОДИСБИОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ТКАНИ ПОЛОСТИ РТА ПОТРЕБЛЕНИЯ ВЫСОКООЛЕИНОВОГО ПОДСОЛНЕЧНОГО МАСЛА

*Кормление крыс высокоолеиновым подсолнечным маслом (85 % олеиновой кислоты) в течение 40 дней не повышает в десне, слизистой щеки, в печени и в сыворотке крови активность уреазы и не снижает активность лизоцима, не вызывает развитие дисбиоза.*

**Ключевые слова:** высокоолеиновое подсолнечное масло, дисбиоз, оральные ткани, сыворотка крови, печень.

**И. Г. Топов**

Державна установа «Інститут стоматології та щелепно-лицевої хірургії Національної академії медичних наук України

#### ВІДСУТНІСТЬ ПРОДИСБІОТИЧНОЇ ДІЇ НА ТКАНИНИ РОТОВОЇ ПОРОЖНИНИ СПОЖИВАННЯ ВИСОКООЛЕЙНОВОЇ СОНЯШНИКОВОЇ ОЛІЇ

*Годівля щурів високоолеїною соняшниковою олією не підвищує в яснах, щогці, печінці і сироватці крові активності уреазы, не знижує активності лізоциму, не викликає розвиток дисбіозу.*

**Ключові слова:** високоолеїнова соняшникова олія, дисбіоз, оральні тканини, сироватка крові, печінка.